

CYP3A4誘導における核内受容体NR1?群の役割

著者	松原 勤
号	40
学位授与番号	396
URL	http://hdl.handle.net/10097/36675

氏 名（本籍） まつ 松 ばら 原 つとむ 勤

学 位 の 種 類 博 士（薬 学）

学 位 記 番 号 薬 博 第 3 9 6 号

学位授与年月日 平 成 19 年 3 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学 位 論 文 題 目

CYP3A4 誘導における核内受容体 NR1I 群の役割

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 山 添 康
教 授 中 畑 則 道
助教授 関 政 幸

論文内容要旨

薬物代謝酵素は、血中の薬物濃度を決定し、薬効ならびに毒性発現を決定する主な因子と考えられている。薬物併用時の薬物代謝酵素の誘導ならびに阻害は、薬効の減弱ならび副作用発現の背景要因となっている。そのため、薬物代謝酵素活性の変動に関する知見は、治療効果の向上と副作用発現の回避、ならびに医薬品開発に欠くことのできない要素と考えられる。

チトクローム P450 (CYP) は、代表的な薬物代謝酵素で、脂溶性物質の酸化に機能している。なかでも CYP3A4 は、肝および小腸で多く発現し、現在汎用されている半数以上の薬物の代謝に関わっており、薬物代謝能を決定する重要な因子である。CYP3A4 活性は、大きな個人差が認められており、遺伝的背景に加えて環境因子の影響を受けている。遺伝的背景に起因する CYP3A4 活性の個人差は、ゲノミクスを用いた手法で予測可能になりつつある。しかし、環境的背景に起因する CYP3A4 活性の個人差は、環境因子と CYP3A4 発現レベルの変動に関する知見が十分でなく、精度よく予測するには至っていない。そのため、環境因子と CYP3A4 発現レベルの変動に関する詳細な知見が必要とされている。

化学物質による CYP3A4 遺伝子転写活性化 (CYP3A4 誘導) は、核内受容体 NR1I 群に含まれる pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) ならびに vitamin D receptor (VDR) を介して起こるとされている。これら核内受容体は CYP3A4 遺伝子上流の結合サイトを共有し、協調的に働いている。したがって CYP3A4 誘導の分子機序を正確に理解するには、PXR, CAR および VDR の寄与を明確に区別する必要がある。そこで本研究では、種々の化学物質の CYP3A4 誘導能を評価し、核内受容体に対する small interfering RNA (siRNA) を発現アデノウイルスを用いて、化学物質による CYP3A4 誘導における各受容体の関与について検討した。

まず、外来異物として農薬に着目した。農薬は、動植物の駆除の目的で使用され、最終的に環境中に放出される。環境中に放出された農薬は、食物、空気、水などを介して、ヒトへ取り込まれる危険性があり、肝薬物代謝能に影響与える可能性がある。しかしながら、農薬の CYP3A4 誘導能は十分に評価されていない。そこで、CYP3A4 誘導能を簡便に評価できる CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (3-1-10 細胞) を用いて、5 種の殺菌剤/防カビ剤 [tetrachloroisophthalonitrile (TPN), エクロメゾル, イソプロチオラン, メプロニルおよびフルトラニル], 5 種の殺虫剤 [クロロピリフォス, O,O-diethyl-O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate (MEP), エオトキサゾール, O-ethyl-O-4-nitrophenylphenyl phosphonothioate (EPN) およびイソキサチオン] ならびに 7 種の除草剤 [クロロネブ, 2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-1,3,5-triazin (CAT), プロピザミド, ピリブチカルブ, ジチオピル, イソフェンフォスおよびダイムロン] の CYP3A4 誘導能を評価した。その結果, EPN, イソキサチオンおよびピリブチカルブは強い CYP3A4 誘導能を示した。さらに, ピリブチカルブによる CYP3A4 レポーター活性の濃度依存の変動を, ヒト PXR アクチベーターであり典型的な CYP3A4 誘導物質であるリファンピシン (RIF) ならびにクロトリマゾールと比較検討したところ, ピリブチカルブは RIF やクロトリマゾールより低濃度で CYP3A4 を誘導し, ピリブチカルブの見かけ上の EC_{50} 値は RIF の EC_{50} 値の約 1/10 であった (ピリブ

チカルブ, 0.21 μ M; RIF, 2.18 μ M)。さらに, hPXR-siRNA 発現アデノウイルスを用いて, EPN, イソキサチオンおよびピリブチカルブによる CYP3A4 誘導における PXR の寄与を検討した。その結果, RIF 添加時と同様に, ピリブチカルブ, イソキサチオンならびに EPN 添加による CYP3A4 レポーター活性の上昇は hPXR-siRNA 発現アデノウイルスの力価依存的に減少した。なお, 代表的な VDR アクチベーターである 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン D₃ (VD₃) 添加時の CYP3A4 レポーター活性の上昇は, hPXR-siRNA 導入による影響を受けなかった。レポーター活性に加えて, 内因性 CYP3A4 遺伝子の転写について解析するために, CYP3A4 mRNA レベルに対する各種農薬や核内受容体-siRNA の効果を検討したところ, CYP3A4 レポーター活性の結果と非常に類似した結果が得られた。最後に, 体内動態を考慮したピリブチカルブの CYP3A4 誘導能を, マウス個体を用いた in vivo レポーターアッセイにより評価した。その結果, ヒト PXR 非導入時はピリブチカルブ投与による CYP3A4 レポーター活性の上昇は認められなかったが, アデノウイルスを用いてヒト PXR をマウス肝に発現させると, ピリブチカルブの投与により CYP3A4 レポーター活性が上昇した。本研究により, 環境中に CYP3A4 誘導能を持つ農薬の存在が明らかになった。今回検討した構造の異なる 17 種の農薬の CYP3A4 誘導能を評価した結果, ピリブチカルブ, イソキサチオンならびに EPN は, 強力な CYP3A4 誘導物質であると推定された。なかでもピリブチカルブは RIF よりも低濃度で CYP3A4 誘導すると予想された。加えて, ピリブチカルブ, イソキサチオンならびに EPN は PXR を介して CYP3A4 誘導を起こしていると示唆された。

次に, 内因性の CYP3A4 誘導物質として胆汁酸に着目した。胆汁酸は, 肝でコレステロールから生合成され, そのほとんどが腸肝循環をしており, 肝と腸管に局在している。この分布は CYP3A4 の発現部位と類似しており, 胆汁酸は, CYP3A4 発現レベルに影響している可能性がある。そこで本研究では, 肝モデル細胞としてヒト肝癌由来 HepG2 細胞を, また小腸モデル細胞としてヒト結腸癌由来 LS174T 細胞を用いて, コール酸, ケノデオキシコール酸, デオキシコール酸, リトコール酸 (LCA) およびウルソデオキシコール酸の CYP3A4 誘導能を CYP3A4 レポーター活性により評価した。HepG2 細胞および LS174T 細胞ともに 10 μ M LCA 添加で著しいレポーター活性の上昇が認められたが, 他の胆汁酸添加 (100 μ M まで検討) では, 著しいレポーター活性の上昇は認められなかった。また, LCA 濃度依存的 CYP3A4 レポーター活性の変動を HepG2 細胞と LS174T 細胞で比較検討した。その結果, LCA 添加による CYP3A4 レポーター活性の上昇は, HepG2 細胞よりも LS174T 細胞の方が, 低濃度で認められた。一方, RIF 添加による CYP3A4 レポーター活性の上昇は, LS174T 細胞よりも HepG2 細胞の方が低濃度で認められた。LCA の CYP3A4 誘導プロファイルは, ヒト PXR アクチベーターである RIF の CYP3A4 誘導プロファイルと異なっていた。さらに, LCA による CYP3A4 誘導の分子機序の解析を行った。LCA は核内受容体 PXR, VDR, FXR を活性化することが知られている。LCA よりも FXR に対する高親和性を示す CA や CDCA による CYP3A4 レポーター活性の上昇がほとんど認められなかったため, LCA による CYP3A4 誘導における FXR の寄与は小さいものと考えた。そこで, HepG2 細胞ならびに LS174T 細胞における PXR と VDR の発現レベルを RT-PCR で調べた結果, PXR の発現レベルは HepG2 細胞と LS174T 細胞で同様であったのに対し, VDR の発現レベルは HepG2 細胞よりも LS174T 細胞の方が

高かった。hPXR-siRNA ならびに hVDR-siRNA 発現アデノウイルスを用いて、LCA による CYP3A4 レポーター活性の上昇における PXR ならび VDR の寄与を検討した。PXR アクチベーターである RIF による CYP3A4 レポーター活性の上昇は、HepG2 細胞および LS174T 細胞ともに、hPXR-siRNA 導入により減少したのに対し、LCA による CYP3A4 レポーター活性の上昇は、HepG2 細胞および LS174T 細胞ともに、hPXR-siRNA 導入による大きな変動が認められなかった。一方、hVDR-siRNA 導入により、VDR アクチベーターである VD₃ による CYP3A4 レポーター活性の上昇は、HepG2 細胞および LS174T 細胞ともに減少した。これと同様に、LCA による CYP3A4 レポーター活性の上昇も、hVDR-siRNA 導入により、HepG2 細胞および LS174T 細胞ともに減少した。最後に、体内動態を考慮した LCA の CYP3A 誘導能をマウスにて検討した。LCA 投与によるマウス Cyp3a 誘導は、肝で認められなかったが、小腸で認められた。肝の PXR ならびに VDR の発現レベルを調べた結果、PXR の発現レベルは肝と小腸で同様であったのに対し VDR の発現レベルは肝よりも小腸の方が高かった。そこでヒト VDR を導入することで、LCA 投与による肝 CYP3A 誘導が認められるかを、マウス Cyp3a 発現レベルならびに CYP3A4 レポーターアッセイで評価した。その結果、期待されたとおり、ヒト VDR を導入により LCA 投与による Cyp3a 発現レベルの上昇ならびに CYP3A4 レポーター活性の上昇が認められた。以上より、胆汁酸の CYP3A4 誘導能を評価した結果、LCA が最も強い CYP3A4 誘導能を示した。また、LCA は、肝よりも小腸で CYP3A を強く誘導することから腸管 CYP3A4 誘導物質であると推定され、PXR よりも VDR を介して CYP3A4 誘導を起こしていると示唆された。

本研究で、CYP3A4 遺伝子レポーターアッセイならび核内受容体-siRNA 発現アデノウイルスは、改良点が残されているが、未知化合物の CYP3A4 誘導能の評価ならびに CYP3A4 誘導の機序解析に有効であった。これらのシステムによって、CYP3A4 誘導における核内受容体 NR1I 群の機能ならびに役割が明確になり、複雑な CYP3A4 誘導の分子機序の一端を解明できた。本研究で得られた結果が CYP3A4 発現の個人差予測の実現に貢献し、薬物療法ならびに医薬品開発の向上をもたらすことを期待する。

審査結果の要旨

薬物代謝酵素活性の変動の情報は、治療の最適化と副作用の回避、そして医薬品の開発に欠くことができない。チトクローム P450 (CYP) は、代表的な薬物代謝酵素で、なかでも CYP3A4 は、肝および小腸に発現し、汎用薬物の代謝に深く関わっている。CYP3A4 活性には、大きな個人差がある。現在、環境的背景に起因する CYP3A4 発現レベルの変動に関する知見が十分でなく、精度よく CYP3A4 活性の個人差を予測するには至っていない。CYP3A4 誘導の正確な理解には、核内受容体 PXR, CAR および VDR の寄与を明確に区別する必要がある。本研究では、種々の化学物質の CYP3A4 誘導能を評価し、核内受容体に対する small interfering RNA (siRNA) を発現させて、CYP3A4 誘導における PXR 受容体の関与について検討された。環境中に放出された農薬は、ヒトへ取り込まれると肝薬物代謝能に影響与える可能性がある。CYP3A4 誘導能を簡便に評価できる CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (3-1-10 細胞) を用いて、17 種の農薬の CYP3A4 誘導能を評価した結果、ピリブチカルブ、イソキサチオンならびに EPN は、強力な CYP3A4 誘導物質であると推定された。なかでもピリブチカルブはリファンピシンよりも低濃度で、PXR を介して CYP3A4 誘導を起こすと示唆された。また、胆汁酸 LCA は、肝よりも小腸で CYP3A を強く誘導することから腸管 CYP3A4 誘導物質であると推定され、PXR よりも VDR を介して CYP3A4 誘導を起こしていると示唆された。

本研究では、新たに開発した CYP3A4 遺伝子レポーターアッセイならびに核内受容体 - siRNA 発現アデノウイルスを用いて、未知化合物の CYP3A4 誘導能の評価ならびに CYP3A4 誘導の機序解析への利用性を示した。これらの系は複雑な CYP3A4 誘導の分子機序の理解に有益であり、よって本研究は、薬物代謝領域の研究に寄与すること大であり、博士（薬学・医療薬学）の学位論文として合格と認める。